

## KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 1020000076625 A

(54) PRODUCTION OF XYLITOL

(57) Abstract:

PURPOSE: Provided is xylitol useful in fields such as food and medicine by acting on D-xylulose a microorganism which was transformed with xylitol dehydrogenase gene and has a reducing ability, followed by collecting a product. CONSTITUTION: Xylitol which is useful as a low-calorie sweetener because of a lower calorie than sucrose and sweetness comparable to sucrose, has an anti- dental caries property, is used as a sweetener which can prevent dental caries, and is useful in fields such as food and medicine, is obtained by acting on arabitol a microorganism (e.g. Gluconobacter oxydans ATCC 621) which has an ability of transforming D-arabitol to D-xylulose, acting on the formed D- xylulose a microorganism (e.g. Escherichia coli JM 109) which was transformed with xylitol dehydrogenase gene and has a reducing ability, followed by collecting the formed xylitol.

(51) Int. Cl. 6  
C12N 1/00  
C12N 15/00

(21) 출원번호	10-2000-0005838
(22) 출원일자	2000년02월08일
(30) 우선권주장	99-0314641999년02월09
(71) 출원인	아지노모토 가부시키키카이 일본국 도쿄도 주오구 교비
(72) 발명자	다케나카야스히로 일본가나가와켄가와사키시 도노우치나오토 일본가나가와켄가와사키시 요코제키겐조 일본가나가와켄가와사키시
(74) 대리인	이병호
심사청구 : 없음	

#### (54) 크실리톨의 생산방법

##### 요약

크실리톨 데하이드로게나제를 암호화하는 유전자로 형질전환된 환원력 제공 능력을 갖는 미생물을 D-크실룰로오스에 직

##### 색인어

크실리톨, D-크실룰로오스, 글루코오스, 크실리톨 데하이드로게나제, 암호화, 에스케리치아

##### 명세서

##### 발명의 상세한 설명

##### 발명의 목적

##### 발명이 속하는 기술 및 그 분야 종래기술

본 발명은 크실리톨의 생산방법에 관한 것이다. 크실리톨은 식품 공업, 의약 등의 분야에서 유용하다.

천연 당알콜인 크실리톨의 요구량은 앞으로 증가될 것으로 예측된다. 크실리톨은 열량이 낮고 슈크로오스와 비교하여 췌장 당뇨병의 치료에 있어서 유체 요법(fluid therapy)에 이용되고 있다.

현재 크실리톨의 공업적 생산은 주로 미국 특허 제4,008,825호에 기재된 바와 같이 D-크실로오스의 수소화반응에 따른다.

그러나, 식물 재료의 가수분해에 의해 생산된 바와 같은 D-크실로오스는 값이 비싸다는 단점이 있으며, 따라서 생산 단계 교환 처리에 의해 제거하여야 하며, 생성된 D-크실로오스는 기타 헤미셀룰로오스성 사카라이드를 제거하기 위하여 추가

그러므로, 용이하게 구입할 수 있는 원료를 이용하며 폐기물을 거의 발생시키지 않는 몇가지 크실리톨 생산 방법이 개발되

여 생산할 수 있다 [참조: Can. J. Microbiol., 31, 1985, 467-471; J. Gen. Microbiol., 139, 1993, 1047-54].

이후, 원료로서 D-아라비톨을 이용하여 크실리톨을 생산하는 여러가지 방법이 개발되었다. 문헌[참조: Applied Microbiol. 시단스(Acetobacter suboxydans)를 이용하여 D-아라비톨을 D-크실룰로오스로 전환시키는 방법, 및 또한 칸디다 길리○

그러나, 이 방법은 아라비톨 5.3%를 사용하여 39% 수율로 크실리톨을 수득하는데 112시간이 소요되며, 따라서 수율 및

제EP 403 392A호 [페레 로케트(Roquette Freres)] 및 제EP421 882A호 (페레 로케트)에는 내삼투압성 효모를 사용하여 소머라제의 작용에 의해 D-크실룰로오스로부터 크실로오스와 D-크실룰로오스의 혼합물을 형성시키고, 수득한 크실로오리고 상기 크실로오스를 수소화반응에 의해 크실리톨로 전환시킴을 특징으로 하는 크실리톨의 생산방법이 기재되어 있다

그러나, 상기 언급한 크실리톨의 생산방법들은 출발 물질로서 발효에 의해 생산된 D-아라비톨을 이용하고, 이를 다단계

### 발명이 이루고자하는 기술적 과제

상기 언급한 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명자들은 이미 D-아라비톨을 크실리톨로 직접 전환시키는 능력을 갖는 미생물을 분석하여, D-아라비톨 데하이드로게나제 활성 및 D-크실룰로오스 리덕타제 (크실리톨 데하이드로게나제)를 제공함으로써 고수율로 안정하게 크실리톨을 생산할 수 있다는 것을 발견하였다 (일본 특허원 제10-258961호).

본 발명의 목적은 상기 언급한 발견을 이용하여 D-크실룰로오스를 크실리톨로 전환시키는 것을 효율적으로 수행하기 위

### 발명의 구성 및 작용

상기 언급한 목적을 성취하기 위하여 기술인 본 발명자들의 연구 결과, 증강된 크실리톨 데하이드로게나제 활성과 환원력

즉, 본 발명은 크실리톨 데하이드로게나제를 암호화하는 유전자로 형질전환된 환원력 제공 능력을 갖는 미생물을 D-크실

본 발명의 상기 언급한 방법의 바람직한 양태에 따르면, 환원력 제공 능력을 갖는 미생물은 에스케리치아속에 속하는 세

본 발명의 상기 언급한 다른 바람직한 양태에 따르면, 상기 방법은 D-아라비톨을 D-크실룰로오스로 전환시키는 능력을 클로오스와 반응시키는 단계를 포함한다.

본 발명의 상기 언급한 또 다른 바람직한 양태에 따르면, 상기 방법은 적합한 배지중에서 글루코오스로부터 D-크실룰로오스 배지중에서 생산된 D-크실룰로오스와 반응시키는 단계를 포함한다.

본 발명은 또한 크실리톨 데하이드로게나제를 암호화하는 유전자로 형질전환된 환원력 제공 능력을 갖는 미생물과 D-아라비톨을 생산하는 방법을 제공한다.

본 발명은 또한, 크실리톨 데하이드로게나제를 암호화하는 유전자로 형질전환된 환원력 제공 능력을 갖는 미생물과 글루코오스 방법을 제공한다.

이후, 본 발명이 상세하게 설명된다.

본 발명에서 사용되는 미생물은 크실리톨 데하이드로게나제를 암호화하는 유전자로 형질전환된 환원력 제공 능력을 갖는

본 발명의 미생물은 환원력 제공 능력을 갖는 미생물을 크실리톨 데하이드로게나제를 암호화하는 유전자로 형질전환시켜 환원 반응을 진행시키기에 충분한 양으로 NADH (니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오타이드의 환원형)를 제공할 수 있는 능력 이유는 상기 반응에 요구되는 NADH의 공급이 불충분하기 때문인 것으로 제시되어 있다. 또한 본 발명자들은 탄소원 또는 크실리톨 데하이드로게나제를 암호화하는 유전자로 상기 미생물을 형질전환시킬 경우, D-크실룰로오스의 환원 반응을 충분히 크실리톨을 생산하는 미생물은 본 발명의 환원력 제공 능력을 갖는 미생물이다. 상기와 같은 미생물의 예를들면, 에스케리

상세하게, 환원력 제공 능력을 갖는 미생물을 크실리톨 데하이드로게나제를 암호화하는 유전자로 형질전환시키기 위해서 환시킬 수 있다.

크실리톨 데하이드로게나제를 암호화하는 유전자 공급원으로서, 크실리톨 데하이드로게나제를 갖는 것이라면 어느 미생물(aceti), 아세토박터 리케파시엔스(Acetobacter liquefaciens), 아세토박터 파스투리아누스(Acetobacter pasteurianus), 세라티아 마레스센스(Serratia marcescens), 코리네박테리움 칼루네(Corynebacterium callunae), 브레비박테리움 암모니아게네스(Brevibact

badiofaciens), 슈도모나스 클로로라피스(*Pseudomonas chlororaphis*), 슈도모나스 이너스(*Pseudomonas iners*), 로도오박터(*Agrobacterium radiobacter*), 아르트로박터 파라피네우스(*Arthrobacter paraffineus*), 아르트로박터 하이드로카스(*Corynebacterium faciens*), 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*), 플라보박테리움 페레그리눔(*Flavobacterium* (*Planococcus eucinatus*), 슈도모나스 싱크산타(*Pseudomonas synxantha*), 로도코쿠스 에리트로폴리스(*Rhodococcus* 스트렙토마이세스 코엘리콜로(*Streptomyces coelicolor*), 스트렙토마이세스 플라벨루스(*Streptomyces flavelus*), 스트렙토쉬엔시스(*Streptomyces tanashiensis*), 스트렙토마이세스 비르기니아에(*Streptomyces virginiae*), 스트렙토마이세스 안티아(*Streptomyces antibioticus*) 있다.

상기 언급한 미생물중에서, 예를들어, 피키아 스티피티스 (FEBS Lett., 324, 9 (1993)) 및 모르가넬라 모르가니 (DDBJ/C) 암호화하는 유전자는 크실리톨 데하이드로게나제를 암호화하는 이들 유전자의 뉴클레오타이드 서열을 기본으로 프라이머를 수행함으로써 취득할 수 있다. 상기 프라이머의 특징으로는 서열목록에 서열 번호 1 및 2로 제시되어있는 염기 서열을 갖

크실리톨 데하이드로게나제를 암호화하는 유전자를 숙주 미생물에 도입시키는데 사용되는 벡터는 숙주 미생물중에서 복

에스케리치아 세균에서 작용하는 벡터에 결합시킴으로써 크실리톨 데하이드로게나제를 암호화하는 유전자를 함유하는 2 동상적으로 T4 DNA 리가제와 같은 리가제를 사용하여 수행한다.

상기한 바와 같이 제조된 제조합 플라스미드를 D.A. Morrison의 방법 (Methods in Enzymology, 68, 326 (1979)) 또는 3 숙주 미생물중으로 도입시킬 수 있다. 또한, 크실리톨 데하이드로게나제를 암호화하는 유전자를 또한 형질도입, 트랜스포 (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. (1972))를 이용하는 방법으로 숙주의 염색체중으로 혼입

크실리톨 데하이드로게나제를 암호화하는 유전자의 발현용 프로모터로서, 크실리톨 데하이드로게나제를 암호화하는 유 4 기의 조절하에서 발현시킬 수 있다. 상기와 같은 프로모터로서, 에스케리치아 세균이 숙주로서 사용될 경우, lac 프로모터,

R<sub>1</sub> 프로모터 및 람다 파아지의 P<sub>L</sub> 프로모터, tet 프로모터, amyE 프로모터, spac 프로모터 등이 사용될 수 있다. 또한, pU 한다.

미생물이 크실리톨 데하이드로게나제를 암호화하는 유전자를 함유할 때, 발현 조절 서열을 유전자 자체의 프로모터와 같 프로모터는 모두 강력한 프로모터로서 공지되어 있다.

염색체 DNA의 제조방법, PCR, 플라스미드 DNA의 제조, DNA의 분해 및 결합, 형질전환, 프라이머로서 사용되는 올리고 and Maniatis, T., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press (

크실리톨은 상기한 바와 같이 취득한 크실리톨 데하이드로게나제를 암호화하는 유전자로 형질전환된 환원력 제공 능력을

크실리톨 데하이드로게나제를 암호화하는 유전자로 형질전환시킨 미생물의 배양에 사용되는 배지는 탄소원, 질소원, 미 5

탄소원으로서, 글루코오스, 락토오스, 갈락토오스, 프럭토오스 또는 전분 가수분해물과 같은 슈가; 글리세롤 또는 솔비톨

질소원으로서, 황산암모늄, 염화암모늄 또는 인산암모늄과 같은 무기 암모늄염; 대두 가수분해물과 같은 유기질소; 암모 6

유기 미량 영양소로서 비타민 또는 효모 추출물과 같은 필수 성분을 적합한 양으로 함유시키는 것이 바람직하다. 상기 이

배양은 호기적 조건하에서 16 내지 120시간 동안 수행하는 것이 바람직하다. 배양 온도는 바람직하게는 25 내지 45 °C로

상기한 바와 같이 배양된 세포를 함유하는 배양물, 배양물로부터 분리되어 수집된 세포, 아세톤 처리 또는 동결처리하여 세포, 무세포 추출물 및 분획물을 고정화시켜 생산된 고정화 물질을 D-크실룰로오스와 접촉시키고, 반응시켜 반응 혼합물 7

본 발명의 미생물을 D-크실룰로오스를 함유하는 배지중에서 배양시킴으로써, 크실리톨이 또한 배지중에 생산될 수 있다 실룰로오스가 본 발명에서 바람직하게 사용될 수 있다. 또한, 글루코오스로부터 D-크실룰로오스를 생산할 수 있는 능력; 8

본 발명의 미생물 또는 이로부터 취득한 가공 물질을 D-크실룰로오스에 작용하도록할 때 사용되는 반응 혼합물 또는 배 9

예를들면, 크실리톨은 또한 D-아라비톨을 D-크실룰로오스로 전환시킬 수 있는 능력을 갖는 미생물을 D-아라비톨을 함유 10 생산할 수 있는 능력을 갖는 미생물을 적합한 배지중에서 배양시킨 다음, 본 발명의 미생물을 동일한 배지를 사용하여 배 수 있는 능력을 갖는 미생물과 함께 적합한 배지중에서 본 발명의 미생물을 배양시킴으로써 생산할 수 있다.

D-아라비톨을 D-크실룰로오스로 전환시킬 수 있는 능력을 갖는 미생물의 예로는, 글루코노박터, 아크로모박터, 아그로 11 로테우스, 프로피오니박테리움, 슈도모나스, 로도코쿠스, 스포로사르시나, 스태필로코쿠스, 비브리오, 악티노마두라, 악 이 있다.

더욱 상세하게, 상기 언급한 미생물의 예로는 글루코노박터 옥시단스 (*Gluconobacter oxydans*), 글루코노박터 아사이 (*Agrobacterium tumefaciens*), 아그로박테리움 라디오박터 (*Agrobacterium radiobacter*), 알칼리: *paraffineus*), 아르트로박터 하이드로카르보글루타미쿠스 (*Arthrobacter hydrocarboglutamicus*), 아르트로박터 옥시단스 (*ammoniaenes*), 디바리카툼 (*divaricatum*), 브레비박테리움 락토펙페르멘툼 (*Brevibacterium lactofermentum*), 브레비: (*Brevibacterium ketoglutamicum*), 브레비박테리움 헬콜룸 (*Brevibacterium helcolum*), 브레비박테리움 푸실룸 (*Brevib: immariophilum*), 브레비박테리움 리넨스 (*Brevibacterium lines*), 브레비박테리움 프로토파르미에 (*Brevibacterium prot 코리네박테리움 아세트아시도필룸* (*Corynebacterium acetoacidophilum*), 코리네박테리움 아세트글루타미쿰 (*Coryneb: 르비콜러* (*Erwinia herbicola*), 에르위니아 크리스안테미 (*Erwinia chrysanthemi*), 플라보박테리움 페레그리눔 (*Flavobac 라보박테리움 세와넨스* (*Flavobacterium sewanense*), 플라보박테리움 브레브 (*Flavobacterium breve*), 플라보박테리움 카르디아 루고사 (*Nocardia rugosa*), 플라노코쿠스 유시나투스 (*Planococcus eucinatus*), 프로테우스 레트게리 (*Proteu 모나스 플루오레스센스* (*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 오발리스 (*Pseudomonas ovalis*), 슈도모나스 스트루제리 (*testosteroni*), 슈도모나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*), 로도코쿠스 에리트로폴리스 (*Rhodococcus eryth 우레우스* (*Staphylococcus aureus*), 비브리오 메치니코비 (*Vibrio metschnikovii*), 비브리오 티로게네스 (*Vibrio tyrogene 스트렙토마이세스 코엘리콜러* (*Streptomyces coelicolor*), 스트렙토마이세스 플라벨루스 (*Streptomyces flavelus*), 스트 나쉬엔시스 (*Streptomyces tanashiensis*), 스트렙토마이세스 버지니아에 (*Streptomyces virginiae*), 스트렙토마이세스 이: 네스 (*Streptomyces viridochromogenes*), 에어로모나스 살모니시다 (*Aeromonas salmonicida*), 바실루스 푸밀루스 (*Ba freundii*), 마이크로박테리움 암모니아필룸 (*Microbacterium ammoniaphilum*), 세라티아 마르세센스 (*Serratia marcesce*

또한, 구체적인 세균 균주로 다음 균주가 언급된다.

글루코노박터 옥시단스 (*Gluconobacter oxydans*) ATCC621 글루코노박터 서브옥시단스 (*Gluconobacter suboxydans*) I delmarvae) AJ1983 아크로모박터 비스코수스 (*Achromobacter viscosus*) ATCC12448 아크로모박터 락티쿰 (*Achromob. (Arthrobacter citreus)* ATCC11624 아르트로박터 투메센스 (*Arthrobacter tumescens*) ATCC6947 아르트로박터 파라파피네 박터 파라파피네우스 (*Arthrobacter paraffineus*) ATCC19065 아르트로박터 하이드로카르보글루타미쿠스 (*Arthrobacter hydroc divaricatum*) ATCC14020 브레비박테리움 락토펙페르멘툼 (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13655 브레비박테리움 레비박테리움 푸스쿰 (*Brevibacterium fuscum*) AJ3124 브레비박테리움 케토글루타미쿰 (*Brevibacterium ketoglutamicu 레비박테리움 테스타세움* (*Brevibacterium testaceum*) AJ1464 브레비박테리움 로세움 (*Brevibacterium roseum*) ATCC1 (Brevibacterium protopharmiae) AJ3125 코리네박테리움 아세트오피룸 (*Corynebacterium acetophilum*) NRRLB3421 코리: acetoacidophilum) ATCC 13870 코리네박테리움 아세트아시도필룸 ATCC 21407 코리네박테리움 아세트글루타미쿰 (Co 라 (*Erwinia carotovora*) CCM969 에르위니아 카로토보라 AJ2992 에르위니아 허비콜러 (*Erwinia herbicola*) ATCC 23822 AJ2478 플라보박테리움 아우란티눔 (*Flavobacterium aurantinum*) AJ2466 플라보박테리움 레나눔 (*Flavobacterium rhen meningosepticum*) ATCC 13253 마이크로코쿠스 중 CCM825 노카르디아 오파카 (*Nocardia opaca*) NCIB9409 노카르디아: 우스 레트게리 AJ2770 모르가넬라 모르가니 (*Morganella morganii*) AJ2771 프로피오니박테리움 웨르마니 (*Propionibact (Pseudomonas fluorescens)* IFO 3757 슈도모나스 플루오레스센스 (*Pseudomonas fluorescens*) ATCC 13525 슈도모나스: 스 (*Pseudomonas mucidolens*) ATCC4685 슈도모나스 테스토스테로니 (*Pseudomonas testosteroni*) ATCC17409 슈도: ATCC 4273 로도코쿠스 로도크로우스 (*Rhodococcus rhodochrous*) ATCC 21199 로도코쿠스 로도크로우스 (*Rhodococc 15592 로도코쿠스 중 ATCC 19070 스포로사르시나 우레에* (*Sporosarcina ureae*) AJ1232 스태필로코쿠스 아우레우스 (*Sta ATCC19425 악티노마이세스 비올라세오코로모게네스* (*Actinomyces violaceochromogenes*) IFO13100 카타사토스포리: 이세스 그리세올루스 (*Streptomyces griseolus*) NRRL B-1062 스트렙토마이세스 리비단스 (*Streptomyces lividans*) IFO: (Streptomyces virginiae) AJ9053 스트렙토마이세스 안티비오티쿠스 (*Streptomyces antibioticus*) NRRL3238 스트렙토마: viridochromogenes) IFO3113 에어로모나스 살모니시다 (*Aeromonas salmonicida*) ATCC 14174 아우레오박테리움 사페 thiaminolyticus) IAM 103 에스케리치아 콜라이 (*Escherichia coli*) IAM 1204 에스케리치아 콜라이 (*Escherichia coli*) IAM freundii) IFM S-36 마이크로박테리움 암모니아필룸 (*Microbacterium ammoniaphilum*) ATCC 15354 세라티아 마그세센: citri) IAM1648 아크로모박터 락티쿰 AJ2394는 Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Tec International Trade and Industry)에 1984년 1월 20일자로 수탁번호 FERM P-7401로 기탁되었다. 이 균주는 2000년 1

브레비박테리움 테스타세움 AJ1464는 Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology Trade and Industry)에 1987년 7월 11일자로 수탁번호 FERM P-9469로 기탁되었다. 이 균주는 2000년 1월 6일자로 국

브레비박테리움 프로토파르미에 AJ3125는 Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Techno International Trade and Industry)에 1995년 2월 23일자로 수탁번호 FERM P-14784로 기탁되었다. 이 균주는 2000년 1

에르위니아 카로토보라 AJ2992는 Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Mi and Industry)에 1987년 1월 19일자로 수탁번호 FERM P-9135로 기탁되었다. 이 균주는 1987년 10월 27일자로 국제 7

플라보박테리움 아우란티눔 AJ2466은 Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology Trade and Industry)에 1984년 1월 20일자로 수탁번호 FERM P-7402로 기탁되었다. 이 균주는 2000년 1월 6일자로 국

플라보박테리움 레나눔 AJ2468은 Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Mi

and Industry)에 1985년 9월 30일자로 수탁번호 FERM P-8459로 기탁되었다. 이 균주는 1988년 4월 21일자로 국제 기  
 플라보박테리움 세와넨스 AJ2476은 Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, I  
 호 FERM P-7052로 기탁되었다. 이 균주는 1984년 2월 2일자로 국제 기탁으로 이전되었으며, 수탁번호는 FERM BP-47  
 살모넬라 티피부리움 AJ2636은 Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Minis  
 FERM P-9470으로 기탁되었다. 이 균주는 1998년 11월 2일자로 국제 기탁으로 이전되었으며, 수탁번호는 FERM BP-6  
 프로테우스 레트게리 NRRL B-11344는 Agricultural Research Service Culture Collection에 1978년 7월 13일자로 국제  
 프로테우스 레트게리 AJ2770은 Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Minis  
 and Industry)에 1985년 11월 28일자로 국제 기탁으로 기탁되었으며, 수탁번호는 FERM BP-941이다.  
 스포로사르시나 우레에 AJ1232는 Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Mi  
 and Industry)에 1983년 4월 25일자로 수탁번호 FERM P-7050으로 기탁되었다. 이 균주는 2000년 1월 6일자로 국제 기  
 플라보박테리움 푸카툼 AJ2478은 Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Mi  
 and Industry)에 1983년 4월 25일자로 수탁번호 FERM P-7053으로 기탁되었다. 이 균주는 1998년 9월 9일자로 국제 기  
 플라노코쿠스 유시나투스 AJ1656은 Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, I  
 Trade and Industry)에 1987년 1월 19일자로 수탁번호 FERM P-9133으로 기탁되었다. 이 균주는 1998년 9월 9일자로  
 프로테우스 레트게리 AJ2769는 Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Minis  
 and Industry)에 1983년 4월 25일자로 수탁번호 FERM P-7057로 기탁되었다. 이 균주는 2000년 1월 6일자로 국제 기탁  
 비브리오 티로게네스 AJ2807은 Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Minis  
 and Industry)에 1983년 4월 25일자로 수탁번호 FERM P-7060으로 기탁되었다. 이 균주는 1997년 3월 4일자로 국제 기  
 아크로모박터 델마르배 AJ1983은 Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Mi  
 and Industry)에 1998년 1월 16일자로 수탁번호 FERM P-16593으로 기탁되었다. 이 균주는 2000년 1월 6일자로 국제  
 브레비박테리움 글로보숨 AJ1563은 Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, I  
 Trade and Industry)에 1998년 1월 16일자로 수탁번호 FERM P-16590으로 기탁되었다. 이 균주는 2000년 1월 6일자로  
 브레비박테리움 푸스툼 AJ3124는 Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Mi  
 and Industry)에 1985년 4월 23일자로 수탁번호 FERM P-8194로 기탁되었다. 이 균주는 2000년 1월 6일자로 국제 기탁  
 모르가넬라 모르가니 AJ2771는 Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Minis  
 and Industry)에 1998년 1월 16일자로 수탁번호 FERM P-16594로 기탁되었다. 이 균주는 1998년 9월 9일자로 국제 기  
 키타사토스포리아 파롤로사 AJ9458은 Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology  
 Trade and Industry)에 1998년 1월 16일자로 수탁번호 FERM P-16588로 기탁되었다. 이 균주는 2000년 1월 6일자로  
 스트렙토마이세스 플라벨루스 AJ9012는 Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technolo  
 Trade and Industry)에 1998년 1월 16일자로 수탁번호 FERM P-16585로 기탁되었다. 이 균주는 1998년 9월 9일자로  
 스트렙토마이세스 비르기니아 AJ9053은 Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technolo  
 Trade and Industry)에 1998년 1월 16일자로 수탁번호 FERM P-16587로 기탁되었다. 이 균주는 1998년 9월 9일자로  
 에르위나 카로토보라 CCM969, 플라보박테리움 페레그리눔 CCM1080-A, 마이크로코쿠스종 CCM825 및 세라티아 마그  
 노카르디아 오파카 NCIB9409 및 노카르디아 루고사 NCIB 8926은 다음 기관으로부터 입수가능하다: National Collection  
 글루코노박터 옥시단스 아종 옥시단스 IFO14819, 글루코노박터 아사이 IFO3276, 스타필로코쿠스 아우레우스 IFO3761,  
 관으로부터 입수가능하다: Institute for Fermentation (Osaka 소재) (주소: 17-85, Juso-honmachi 2-chome, Yodogaw  
 글루코노박터 옥시단스 IAM 1842, 프로피오니박테리움 셰르마니 IAM1725, 알칼리게네스 패칼리스 IAM1015, IAM1725  
 1137, 및 크산토모나스 시트리 IAM 648은 다음 기관으로부터 입수가능하다: Institute of Molecular and Cellular Bioscie  
 에스케리치아 프룬디 IFM S-36은 다음으로부터 입수가능하다: the Research Center for Pathogenic Fungi and Microbi

다른 균주는 다음 기관으로부터 입수가 가능하다: the American Type Culture Collection (주소: 12301 Parklawn Drive, Ro

이들 미생물 배양용으로 사용되는 배지는 특별하게 제한되지 않으며, 탄소원, 질소원 및 무기 이온 뿐만 아니라 경우에 따  
수, 압모늄염 및 기타 물질이 사용될 수 있다. 무기 이온으로서, 마그네슘 이온, 인산 이온, 칼륨 이온, 철 이온, 망간 이온  
제인 분해 생성물 등이 적합하게 사용될 수 있다.

또한, D-크실로오스, D-크실룰로오스, D-아라비톨 및 크실리톨과 같은 사카라이드 및 당 알코올을 효소 유도제로서 배지  
배양 조건 또한 특별하게 제한되지 않으며, 예를들어, pH 5 내지 8 및 25 내지 40 °C의 온도 범위내에서 12 내지 72시간

D-크실룰로오스는 상기한 바와 같이 수득한 세포를 함유하는 배양물, 배양물로부터 분리되고 수집된 세포, 아세트 처리  
된 세포, 무세포 추출물 및 분획물을 고정화시킴으로써 생산된 고정화 물질을 D-아라비톨과 접촉시키고 반응시킴으로써

일반적으로, 20 내지 60 °C, 바람직하게는 30 내지 40 °C에서, pH 4.0 내지 9.0, 바람직하게는 6.5 내지 8.0에서 반응을  
라 변화될 수 있지만, 일반적으로 1 내지 100시간이다. 또한, 글루코오스 및 에탄올과 같은 탄소원을 반응에 가함으로써,

또한, 상기 언급한 미생물을 D-아라비톨을 함유하는 배지에서 배양시킴으로써, D-아라비톨로부터 D-크실룰로오스를

본 발명의 방법에 의해 크실리톨을 생산할 경우, 상기한 바와 같이 생산된 D-크실룰로오스를 반응 완결후 그대로 반응 혼  
사용하는 방법 및 기타 동상의 수집 및 분리법을 사용할 수 있다.

글루코오스로부터 D-크실룰로오스를 생산할 수 있는 능력을 갖는 미생물의 예로는 글루코노박터, 아세트박터 또는 프라

상기와 같은 미생물의 특징에는 다음과 같다:글루코노박터 세리누스 (*Gluconobacter cerinus*), 글루코노박터 옥시단스 (*G*  
누스,프라투리아 아우란티아 (*Frateruria aurantia*) 등.

특정 세균 균주는 다음과 같다:글루코노박터 세리누스 IFO3262글루코노박터 옥시단스 ATCC8147글루코노박터 옥시단스  
루코노박터 옥시단스 아종 서브옥시단스 IFO3172글루코노박터 옥시단스 아종 서브옥시단스 IFO3130아세트박터 아세티  
시단스 ATCC621 및 글루코노박터 옥시단스 ATCC8147, 아세트박터 아세티 아종 크실리눔 ATCC14851, 및 아세트박터

글루코노박터 세리누스 IFO3262, 글루코노박터 옥시단스 IFO3293, 글루코노박터 옥시단스 IFO3250, 글루코노박터 옥  
단스 IFO3130, 아세트박터 파스투리아누스 IFO3222, 아세트박터 파스투리아누스 IFO3223 및 프라투리아 아우란티아 IF

글루코노박터 옥시단스 IAM1839는 다음으로부터 입수가 가능하다: the Institute of Molecular and Cellular Biosciences (전

진술한 미생물 배양용 배양 배지는 동상의 탄소원, 질소원, 무기 이온 뿐만 아니라 필요에 따라 유기 영양소를 함유하는

탄소원으로서, 글루코오스와 같은 탄수화물, 글리세롤과 같은 알코올, 유기산 등이 적합하게 사용될 수 있다. 크실리톨의 동  
크로오스 및 락토오스와 같은 디사카라이드, 및 전분과 같은 폴리사카라이드가 바람직하다. 이들 물질은 배지중 주 탄소

질소원으로서, 암모니아 가스, 암모니아수, 암모늄염 등이 사용된다. 무기 이온으로서, 마그네슘 이온, 인산 이온, 칼륨 이  
수수 침지액, 카제인 분해 생성물 등이 필요에 따라 사용된다.

배양 조건 또한 특별하게 제한되지 않는다. 그러나, 미생물은 일반적으로, 5 내지 8의 pH 범위내에서, 25 내지 40 °C 온도  
탄소원이 소모될 때까지, 즉, 통상적으로 3 내지 8일간 배양시키는 것이 바람직하다.

크실리톨을 본 발명의 방법으로 생산할 경우, 상기한 바와 같이 배지중에 생산된 D-크실룰로오스를 배지 상태 그대로 사  
동상의 수집 및 분리 방법을 사용할 수 있다.

상기한 바와 같이 생산된 크실리톨은 동상의 방법으로 반응 혼합물로부터 분리하여 수집할 수 있다. 상술하면, 예를들어,

본 발명에 따라서, 크실리톨을 글루코오스, D-아라비톨 또는 D-크실룰로오스로부터 효율적으로 생산할 수 있다.

본 발명은 다음 실시예를 참고로하여 더욱 상세하게 설명된다. 그러나, 본 발명이 이들 실시예로 제한되는 것은 아니다.

컬럼: Shodex SC1211 (Showa Denko, Japan)이동상: 50% 아세트니트릴/50% Ca-EDTA의 50ppm 수용액유속: 0.8 ml

온도: 60 °C검출: RI 검출기실시에 1크실리톨 데하이드로게나제를 암호화하는 유전자로 형질전환시킨 에스케리치아 콜리  
여, 서열 목록에서 서열 번호 1 및 2로 표시된 뉴클레오타이드 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 합성한다.

이들 합성 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로서, 상기 균주의 게놈 DNA를 주형으로서 사용하여 통상의 조건으로 PCR을 후, 상기 단편의 양쪽 말단을 EcoRI 및 BamHI로 분해시키고, pUC18 (Takara Shuzo)의 EcoRI 및 BamHI 분해 생성물에 기 크실리톨 데하이드로게나제를 암호화하는 유전자를 함유하는 경우, lac Z 유전자를 갖는 융합 유전자로서 lac 프로모

형질전환 균주의 크실리톨 데하이드로게나제 활성은 다음과 같이 측정한다. L 배지 (트립톤 1%, 효모 추출물 0.5%, NaC 유하는 반응 혼합물 1 ml중에 30 °C에서 1분간 반응을 수행한다. NADH 또는 NADPH의 생산을 340 nm에서의 흡광도 증

그 결과, 형질전환 균주에서는 3.9 U/mg의 크실리톨 데하이드로게나제 활성이 나타나는 반면, 대조균으로 사용되는 에스 따라서, 형질전환체 균주가 크실리톨 데하이드로게나제를 암호화하는 유전자를 갖는다는 것이 확인된다.

실시에 2글루코노박터 옥시단스 및 크실리톨 데하이드로게나제를 암호화하는 유전자로 형질전환시킨 에스케리치아 콜리 0.5%, 만니톨 3% 및 탄산칼슘 2%를 함유하는 배지 (pH 6.0) 3 ml를 포함하는 시험관에 접종시키고, 30 °C에서 16시간 물 0.05%, 황산철 7수화물 0.001%, 황산망간 n-수화물 0.001%, D-아라비톨 5% 및 탄산칼슘 2%를 함유하는 배지 (pH

(2) D-크실룰로오스로부터의 크실리톨의 생산상기 세포를 상기 수득한 D-크실룰로오스를 함유하는 배지로부터 원심분리

먼저, 상기 언급한 형질전환체 균주를 효모 추출물 0.5%, 펩톤 0.5%, 고기 추출물 0.5%, 황산암모늄 0.5%, 인산이수소 6.0) 4 ml를 포함하는 시험관에 접종시키고, 30 °C에서 진탕시키며 16시간 동안 배양시킨다. 이후, 상기 배지 1 ml를 상기 의 최종 농도로 가하고, 4시간 동안 배양을 계속한다. 상기한 바와 같이 수득한 배지를 (1)에서 수득한 D-크실룰로오스를

상기 (1) 및 (2)의 공정을 합하여, 글루코노박터 옥시단스 및 크실리톨 데하이드로게나제를 암호화하는 유전자로 형질전환

실시에 3글루코노박터 옥시단스 및 크실리톨 데하이드로게나제를 암호화하는 유전자로 형질전환시킨 에스케리치아 콜리 0.5%, 만니톨 3% 및 탄산칼슘 2%를 함유하는 배지 (pH 6.0) 3 ml를 포함하는 시험관에 접종시켜, 30 °C에서 16시간 동

한편, 이와 유사하게, 실시에 1에서 생산된, 크실리톨 데하이드로게나제를 암호화하는 유전자로 형질전환시킨 에스케리치아 산망간 n-수화물 0.001%, D-아라비톨 5% 및 탄산칼슘 2%를 함유하는 배지 (pH 6.0) 4 ml를 포함하는 시험관에 접종시 도제로서 1mM의 최종 농도로 상기 배지에 가하고, 4시간 동안 계속 배양시킨다.

글루코노박터 옥시단스 및 크실리톨 데하이드로게나제를 암호화하는 유전자로 형질전환시킨 에스케리치아 콜라이의 동 0.001%, 황산망간 n-수화물 0.001%, D-아라비톨 5% 및 탄산칼슘 2%를 함유하는 배지 (pH 6.0) 50 ml를 포함하는 50

그 결과, 5%의 D-아라비톨로부터 50시간에 4.4%의 농도 (수율: 88%)로 크실리톨이 수득된다.

참고 실시에 1D-아라비톨로부터 D-크실룰로오스의 생산1.8% (w/v) 영양액 (EIKEN CHEMICAL CO., LTD. 제조)을 함유 1에 나타낸 각각의 균체를 상기 언급한 배지에 접종시켜 30 °C에서 2일간 진탕시키며 배양시킨다. 균체를 원심분리에 의

각 배양 균체를 0.1M 인산염 완충액 (pH 7.0)중에 습증량으로 약 5%의 농도로 현탁시킨다. 유리 비드 (Biospec Product 고, 수득한 파괴된 균체 현탁액을 조 효소 제제로서 이후의 전환 반응에 사용한다.

D-아라비톨 및 NAD를 1M Tris-HCl 완충액 (pH 8.0)에 각각 5% (w/v) 및 10 mM의 최종 농도로 용해시키고, 각 시험관< 생산된 D-크실룰로오스를 HPLC로 측정한다. 결과를 표 1에 나타낸다. 표 1에 나타낸 바와 같이, 각 균체를 사용하여 D-

[표1]

균주	D-글루코오스 생산량(g/ 0
아크로모박 터 델마르베 AJ1983아크 로모박터 비 스쿠수스 ATCC12448 아그로박테 리움 투메파 시엔스 ATCC4720	



아그로박테  
리움 라디오  
박터  
ATCC4718  
알칼리게네  
스 패칼리스  
IAM1015아  
르트로박터  
시트레우스  
ATCC11624  
아르트로박  
터 투메센스  
ATCC6947  
아르트로박  
터 파라피네  
우스  
ATCC15590  
아르트로박  
터 파라피네  
우스  
ATCC15591  
아르트로박  
터 파라피네  
우스  
ATCC19064  
아르트로박  
터 파라피네  
우스  
ATCC19065  
아르트로박  
터 하이드로  
카르보글루  
타미쿠스  
ATCC15583  
아조토박터  
인디쿠스  
ATCC9037  
브레비박테  
리움 암모니  
아게네스  
ATCC6871  
브레비박테  
리움 암모니  
아게네스  
ATCC6872  
브레비박테  
리움 디바리  
카툼  
ATCC14020  
브레비박테  
리움 락토파  
르멘툼  
ATCC13655  
브레비박테  
리움 플라툼  
ATCC13826  
브레비박테  
리움 플라툼  
ATCC21406  
브레비박테

리움 글로보  
 슝 AJ1563  
 브레비박테  
 리움 푸스쿰  
 FERM BP-  
 6983브레비  
 박테리움 케  
 토글루타미  
 쿰  
 ATCC15587  
 브레비박테  
 리움 캐토글  
 루타미쿰  
 ATCC15588  
 코리네박테  
 리움 아세토  
 필쿰  
 NRRLB3421  
 엔테로박터  
 아에로게네  
 스  
 ATCC13048  
 에르위니아  
 아밀로보라  
 IFP12687에  
 르위니아 카  
 로토보라  
 CCM969플  
 라보박테리  
 움 페레그리  
 늑  
 CCM1080-  
 A플라보박  
 테리움 푸카  
 톼 FERM  
 BP-6492마  
 이크로코쿠  
 스중  
 CCM825노  
 르카디아 오  
 파카  
 NCIB9409  
 플라노코쿠  
 스 유시나투  
 스 FERM  
 BP-6493프  
 로테우스 레  
 트게리  
 NRRL  
 11344프로  
 테우스 레트  
 게리 FERM  
 BP-6980프  
 로테우스 레  
 트게리  
 FERM BP-  
 941모르가  
 넬라 모르가  
 니 AJ2771  
 프로피오니

0.40.10.30.10.60.30.40.71.30.81.00.90.10.40.50.50.51.30.30.10.50.40.90.30.10.10.10.10.10.31.0

박테리움 세  
르마니  
IAM1725슈  
도모나스 싱  
크산타  
ATCC796로  
도코쿠스 에  
리트로폴리  
스  
ATCC11048  
스포로사르  
시나 우레에  
FERM BP-  
6979스타필  
로코쿠스 아  
우레우스  
IFO3761비  
브리오 메치  
니코비  
ATCC7708  
비브리오 티  
로게네스  
FERM BP-  
5848

참고 실시예 2D-아라비톨로부터의 D-크실룰로오스의 생산500ml 용적 플라스크에, 효모 추출물 0.2% (w/v), 고기 추출-  
킨 D-아라비톨, 크실리톨 및 D-크실로오스를 각 배지에 1%의 농도로 가한다. 표 2에 나타낸 각각의 균체를 상기 언급한

각 배양 균체를 0.1M 인산염 완충액 (pH 7.0)중에 습증량으로 약 5%의 농도로 현탁시킨다. 유리 비드 (Biospec Product  
고, 수득한 파괴된 균체 현탁액을 조 효소 제제로서 이후의 전환 반응에 사용한다.

D-아라비톨 및 NAD를 1M Tris-HCl 완충액 (pH 8.0)에 각각 5% (w/v) 및 10 mM의 최종 농도로 용해시키고, 각 시험관  
고, 생산된 D-크실룰로오스를 HPLC로 측정한다. 결과를 표 2에 나타낸다. 표 2에 나타낸 바와 같이, 각 균체를 사용하여

### [표2]

균주
악티노마두라 마두래 ATCC19425악티노마이세스 비올라세오크로모제네스 IFO13100키 오티쿠스 NRRL3238스트렙토마이세스 카카오이 ATCC19093스트렙토마이세스 코엘리콜 토마이세스 그리세올루스 NRRL B-1062스트렙토마이세스 라벤톨래 ATCC8664스트렙토 스 ATCC21379스트렙토마이세스 타나쉬엔시스 ATCC15238스트렙토마이세스 비르기니

참고 실시예 3글루코오스로부터의 D-크실룰로오스의 생산황산암모늄 0.2%, 인산이수소칼륨 0.1%, 인산수소이칼륨 0.1  
배지에 5%의 농도로 가한다. 농도 (%)는 중량/용적 (w/v)%로 표시된다.

표 3에 나타낸 각각의 균체를 상기 언급한 배지에 접종시켜 30 ℃에서 1일간 진탕시키며 배양시킨다. 이를 씨드 배양으로  
균시킨다. 별도로 멸균시킨 D-글루코오스 및 탄산칼슘을 배지에 각각 5% 및 4%의 농도로 가한다. 상기 언급한 씨드 배  
측정한다. 결과를 표 3에 나타낸다.

### [표3]

균주
글루코노박터 세리누스 IFO3262글루코노박터 옥시단스 ATCC8147글루코노박터 옥시단 IFO3292글루코노박터 옥시단스 IFO3294글루코노박터 옥시단스 아종 옥시단스 IFO318 아세토박터 아세티 아종 크실리눔 ATCC14851아세토박터 리퀘파시엔스 ATCC14835아-

발명의 효과

본 발명에 의해 글루코오스, D-아라비톨 또는 D-크실룰로오스로부터 크실리톨을 효율적으로 생산할 수 있다.

<110> AJINOMOTO CO., INC.

<120> Method for producing xylitol

<130> 5-1998-096241-9

<150> JP 99-031464

<151> 1999-02-09

<150> JP 99-197621

<151> 1999-07-12

<160> 2

<170> KOPATIN 1.5

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 1

cggggaattcg atatactttt aatgaa 26

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 2

ggcggatccg cagtcaatac cggcataga 29

### (57) 청구의 범위

#### 청구항1

크실리톨 테하이드로게나제를 암호화하는 유전자로 형질전환된 환원력 제공 능력을 갖는 미생물을 D-크실룰로오스와 빈

#### 청구항2

제1항에 있어서, 환원력 제공 능력을 갖는 미생물이 에스케리치아속에 속하는 세균인 방법.

#### 청구항3

제2항에 있어서, 에스케리치아속에 속하는 세균이 에스케리치아 콜라이인 방법.

#### 청구항4

제1항에 있어서, D-아라비톨을 D-크실룰로오스로 전환시키는 능력을 갖는 미생물을 D-아라비톨과 반응시켜 D-크실룰:

#### 청구항5

제4항에 있어서, D-아라비톨을 D-크실룰로오스로 전환시키는 능력을 갖는 미생물이 글루코노박터, 아크로모박터, 아그 프로테우스, 프로피오니박테리움, 슈도모나스, 로도코쿠스, 스포로사르시나, 스탕필로코쿠스, 비브리오, 악티노마두라, 물인 방법.

**청구항6**

제1항에 있어서, 적합한 배지중에서 글루코오스로부터 D-크실룰로오스를 생산하는 능력을 갖는 미생물을 배양시켜 D-크실룰로오스를 포함하는 방법.

**청구항7**

제6항에 있어서, 글루코오스로부터 D-크실룰로오스를 생산하는 능력을 갖는 미생물이 글루코노박터, 아세토박터 또는 그 변종을 포함하는 방법.

**청구항8**

크실리톨 데하이드로게나제를 암호화하는 유전자로 형질전환된 환원력 제공 능력을 갖는 미생물과 D-아라비톨을 D-크실룰로오스로 전환시키는 방법.

**청구항9**

크실리톨 데하이드로게나제를 암호화하는 유전자로 형질전환된 환원력 제공 능력을 갖는 미생물 및 글루코오스로부터 D-크실룰로오스를 생산하는 방법.